

AValiação da Inclusão de Bacillus subtilis sobre a Digestibilidade e Composição da Microbiota Intestinal de Cães Adultos

LIEGE TEIXEIRA¹, JÉSSICA N. D'AVILA¹, GIOVANE KREBS¹, ANDERSON S. C. DA CUNHA¹, LARISSA G. DELFINO¹, VICTÓRIA N. DE CAMARGO¹ E LUCIANO TREVIZAN¹

¹ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Contato: lialumel@gmail.com / Apresentador: GIOVANE KREBS¹

Resumo: Probióticos desempenham importante papel na recuperação após distúrbios gastrintestinais ou pelo uso de antimicrobianos. Dentre as bactérias estudadas está o *Bacillus subtilis* (BS). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inclusão de BS sobre a digestibilidade das dietas, qualidade das fezes, urina, contagem fecal de esporos e alterações na microbiota intestinal. Foram utilizados 13 cães, distribuídos aleatoriamente em 2 tratamentos, dieta controle e dieta controle adicionada de BS, durante 30 dias, sendo 25 dias de adaptação às dietas e cinco dias de coleta total de fezes e urina. Para avaliação da microbiota e contagem bacteriana, amostras foram coletadas nos dias 0 e 30 e dias 0, 15 e 30. Para análise estatística foi utilizado Teste T no software Jamovi® considerando o efeito do “tempo” e “dietas”. Na dieta controle não houve crescimento de BS ($p < 0,05$). Na dieta BS houve aumento da excreção fecal de BS no dia 15 e 30. A inclusão de BS não influenciou os coeficientes de digestibilidade do alimento. Houve diferença no tempo para *Erysipelotrichaceae*, *Selenomonadaceae* aumentando em ambas dietas e inibição do crescimento de *Peptostreptococcaceae* e *Turicibacteraceae* pela dieta BS. As modificações observadas na microbiota fecal continuam sendo estudadas.

Palavras-Chaves: microbioma; probióticos; equilíbrio intestinal.

EVALUATION OF THE INCLUSION OF BACILLUS SUBTILIS ON DIGESTIBILITY AND MICROBIOTA OF ADULT DOGS

Abstract: Probiotics play an essential role in recovery after gastrointestinal disorders or by the use of antimicrobials, in addition to serving as modulators of the immune system. Among the bacteria studied are *Bacillus subtilis* (strain LOFU 160) due to their ability to inhibit the growth of pathogenic microorganisms and restore intestinal balance. The present study aimed to evaluate the effect of the inclusion of BS on the digestibility of diets and quality parameters of feces, urine and microbiota. Thirteen Beagle dogs were used, randomly distributed into 2 treatments, for 30 days, with 25 days of adaptation to the diets and five days of total collection of feces and urine. To evaluate the microbiota and bacterial count, feces were collected on days 0 and 30 of the experiment and days 0, 15 and 30, respectively. For statistical analysis, the T test was used in the Jamovi® software. The inclusion of BS (0.02%) in the diets did not influence the digestibility of the food. There was also a difference in time for the families *Erysipelotrichaceae*, *Selenomonadaceae* in both treatments, and there was an inhibition of *Peptostreptococcaceae* and *Turicibacteraceae* by the BS diet. The changes observed in the fecal microbiota continue to be studied.

Keywords: microbiome; probiotics; intestinal balance.

Introdução: Os probióticos são organismos vivos que têm sido utilizados na nutrição por seus efeitos benéficos à saúde gastrointestinal de pessoas e animais. São também considerados adjuvantes no tratamento de doenças gastrintestinais inflamatórias por participarem da restauração da microbiota e da modulação da resposta imune (WILLIAMS, 2010). Entre várias bactérias estudadas, estão os *Bacillus*. Eles são bactérias saprófitas produtoras de esporos, não patogênicas, usadas na fermentação de alguns alimentos. O *Bacillus subtilis* (BS) é uma espécie considerada como probiótico por sua habilidade de produzir enzimas digestivas e metabólitos secundários com capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos (RHAYTH *et al.*, 2019). O objetivo deste trabalho foi avaliar a persistência do BS (cepa LOFU 160) nas dietas e sua passagem pelo trato gastrintestinal, os efeitos sobre a digestibilidade dos nutrientes e energia, escore fecal, características urinárias e microbiota intestinal de cães.

Material e Métodos: Todos os procedimentos de pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal, protocolo n. 41825. Foram utilizados 13 cães adultos. Duas dietas completas e balanceadas compuseram os tratamentos: controle (C) e controle + probiótico BS, com inclusão de 0,02% (BS; Tabela1). Utilizado um delineamento completamente casualizado em dois grupos de cães, que receberam duas refeições ao dia, kcal/dia = 120 kcal x PC (kg)0,75, de acordo com NRC (2006). A água foi fornecida ad libitum ao longo do período experimental. O estudo teve duração de 30 dias, sendo a digestibilidade medida entre o dia 25 e 30 com coleta total de fezes e urina, seguindo o protocolo da AAFCO (2020). As fezes foram coletadas e o escore fecal foi avaliado de acordo com The Waltham Fecal Score (Moxham, 2001). A urina foi coletada, para aferição do volume, pH e densidade. Para avaliação da microbiota e contagem bacteriana foram coletadas fezes nos dias 0 (D0) e 30 (D30) do experimento e dias 0 (D0), 15 (D15) e 30 (D30), respectivamente. Amostras do centro dos cartuchos fecais foram coletadas em até 15 minutos pós defecação, armazenadas em eppendorfs e acondicionadas em freezer a -20°C. As análises de microbiota foram realizadas utilizando a metodologia Dual-index1. Procedimentos de modelos mistos foram implementados para determinar o efeito da dieta nos índices de diversidade Chao1 e Shannon através do teste Kruskal-Wallis, sendo $p < 0,05$ considerado significativo. A análise estatística usou Teste T para comparativo entre os grupos utilizando o programa estatístico Jamovi®.

Resultado e Discussão: As dietas foram aceitas sem indícios de vômitos ou diarreia. Não houve diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos C e BS para digestibilidade aparente dos nutrientes (Tabela 2), resultado esperado e observado no estudo de Felix *et*

al. (2010). Não houve melhora no escore fecal, mas foi determinado como ideal em ambas dietas. Quanto a urina também não houve alterações em ambas dietas. Quanto a composição bacteriana, os principais filos encontrados foram *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Fusobacteria* e *Actinobacteria* (Figura 1), filos predominantes no intestino canino de acordo com Deng & Swanson (2015). Houve aumento das ($p < 0,05$) famílias *Erysipelotrichaceae* e *Selenomonadaceae* para ambos grupos do D0 para o D30. O BS parece ter impedido o aumento das famílias *Peptostreptococcaceae* e *Turicibacteraceae* que foram aumentadas no grupo C no D30 (Figura 2). Ao mesmo tempo o BS aumentou a quantidade do gênero *Megamonas* até o D30. Ainda, o BS reduziu a população de *Phocaeicola* no dia D30. O grupo C teve redução na população *Prevotellamassilia* e aumento na população de *Turicibacter* no dia D30 (Figura 3). São gêneros que atuam no metabolismo de carboidratos e proteínas contribuindo para a estabilidade intestinal (Deng & Swanson, 2015). Na mensuração de microrganismos nas fezes, não foram encontrados esporos e células vegetativas na dieta C nos dias D15 e D30, revelando que não houve contaminação do grupo controle com o probiótico. Já na dieta BS houve diferença nos dias D15 e D30 para presença de esporos nas fezes e D15 para presença de células vegetativas (Tabela 3).

Tabela 1. Relação de nutrientes em cada dieta.

Nutrientes	Dieta	
	Controle	BS
Umidade (%)	10,09	8,04
Proteína Bruta (%)	19,77	19,61
Extrato Etéreo (%)	12,00	11,91
Matéria Fibrosa (%)	3,77	3,33
Matéria Mineral (%)	8,82	8,34
Energia Metabolizável (kcal/kg)	4,355	4,497
Inclusão de Probiótico (%)	-	0,02

BS, *Bacillus subtilis*.

Tabela 2. Consumo de nutrientes, coeficiente da digestibilidade total aparente, energia metabolizável, características fecais e urinárias dos cães alimentados com as dietas experimentais.

Item	Tratamento		p-valor	EP
	Controle	BS		
Consumo de nutrientes, g/d				
Matéria seca	203,95	223,99	0,147	12,8
Matéria orgânica	183,94	203,67	0,118	58,1
Matéria mineral	20,00	20,31	0,803	6,02
Proteína bruta	44,84	47,76	0,315	13,9
Extrato etéreo	27,22	29,10	0,310	8,41
Carboidratos	111,87	126,90	0,060	35,9
Digestibilidade total aparente, %				
Matéria seca	70,51	70,78	0,864	1,55
Matéria orgânica	77,01	77,45	0,734	1,27
Matéria mineral	10,74	3,88	0,163	4,59
Proteína bruta	73,95	73,41	0,740	1,59
Extrato etéreo	86,84	86,21	0,425	0,758
Carboidratos	75,85	76,97	0,453	1,45
Energia bruta	74,51	76,02	0,302	1,39
Energia digestível, kcal/kg	3732	3812	0,217	61,0
Energia metabolizável (MS), kcal/kg	3529	3616	0,156	57,4
Características fecais				
Escore fecal	2,5	2,5	0,268	0,106
Fezes na MS, %	35,30	35,47	0,868	1,01
Fezes, g/d	170,96	185,32	0,401	16,4
Fezes, g/d (MS)	60,20	65,64	0,342	5,48
pH fecal (dia 0)	6,14	6,33	0,233	0,144
pH fecal (dia 15)	6,49	6,30	0,086	0,099
pH fecal (dia 30)	6,41	6,36	0,581	0,088
Características urinárias				
Volume, g	381	385	0,804	56,4
pH urinário	7,06	7,17	0,398	0,141
Densidade urinária	1031 ^a	1024 ^b	0,019	2,72

BS, *Bacillus subtilis*; EP, Erro padrão; MS, matéria seca.

^{a,b} Letras minúsculas na mesma linha, ao lado das médias, dizem respeito a diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 3. Contagem de esporos, células vegetativas e células totais, ao longo de 30 dias, das fezes de animais alimentados com as dietas experimentais.

Parâmetro	Dietas			Tratamento vs dia			Dia	Trat vs dia
	D	D15	D30	D	D15	D30		
Esporos								
Dieta controle	0	0	0	0	0	0	<0,001	<0,001
Dieta BS	0	14,7±0,09	14,6±0,17	0	14,7±0,13	14,6±0,23		
Células vegetativas								
Dieta controle	0	0	0	0	0	0	0,005	0,005
Dieta BS	0	0,69±0,08	0,39±0,10	0	0,69±0,11	0,39±0,14		
Células totais								
Dieta controle	0	0	0	0	0	0	<0,001	<0,001
Dieta BS	0	15,4±0,13	14,8±0,15	0	15,4±0,17	14,8±0,21		

Trat, tratamento; EP, erro padrão; BS, *Bacillus subtilis*.

P-valor; P<0,1, tendência; P<0,05, diferença.

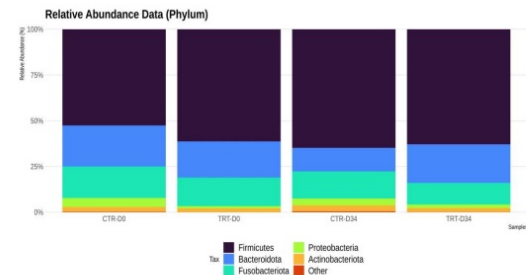


Figura 1. Abundância relativa dos filos encontrados

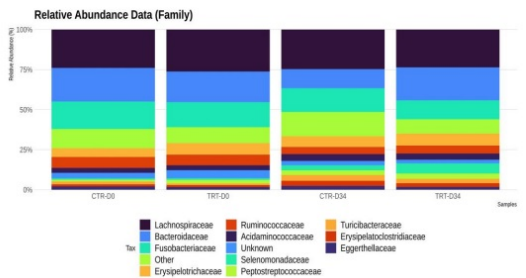


Figura 2. Abundância relativa das famílias encontradas

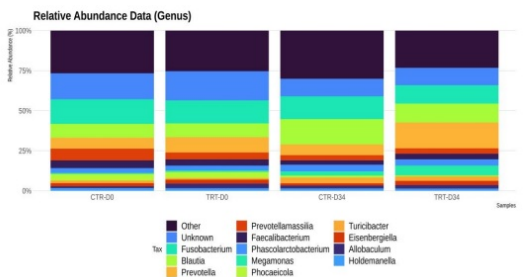


Figura 3. Abundância relativa dos gêneros encontrados

Conclusão: A inclusão de BS não afetou a digestibilidade. Nas fezes do grupo BS houve presença de células vegetativas no dia 15, indícios de colonização intestinal e diferença na composição bacterianas nas famílias *Erysipelotrichaceae*, *Selenomonadaceae*, havendo aumento nos grupos, e *Peptostreptococcaceae* e *Turicibacteraceae*. As alterações na microbiota observadas neste estudo continuam sendo estudadas.

Agradecimentos: Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Biocamp.

Referências Bibliográficas: AAFCO – Association of American Feed Control Officials. Champaign: Official publication. 2020. DEN, P.; SWANSON, K. S. Gut microbiota in human, dogs and cats: current knowledge and future opportunities and challenges. *British Journal of Nutrition*. Wallingford. v.113, p.6-17. 2015. FÉLIX, A., P., NETTO, M., V., T., MURAKAMI, F., Y., BRITO, C., B., M., OLIVEIRA, S., G., MAIORCA, A. Digestibility and fecal characteristics of dogs fed with *Bacillus subtilis* in diet. *Ciência rural*, v. 40, p. 2169-2173. 2010. MOXHAN G. Waltham feces scoring system – A tool for veterinarians and pet owners: How does your pet rate? *WALTHAM Focus*. 11:24-25. 2001. NRC – National Research Council. Nutrient requirements of dogs and cats. Washington: National Academies Press. 2006. RHAYAT, L.; MARESCA, M.; NICOLETTI, C.; PERRIER, J.; BRINCH, K.S.; CHRISTIAN, S.; Effect of *Bacillus subtilis* strains on intestinal barrier function and inflammatory response. *Frontiers in Immunology*, 10, 564. 2019. WILLIAMS, N. Probiotics. *American Journal of Health System Pharmacists*. 67, 449–458. 2010.